

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,
созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ИБХ РАН) Минобрнауки России,
по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 06.12.2023 г. № 29

О присуждении **Гиголаеву Андрею Михайловичу** ученой степени кандидата химических наук.

Диссертация «Молекулярные основы селективности пептидных поровых блокаторов калиевых каналов» по специальности 1.4.9 – Биоорганическая химия принята к защите 28 сентября 2023 г. (протокол заседания № 21) диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН), (адрес: ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997), действующим на основании Приказов Минобрнауки России №75/нк от 15.02.2013 г. и № 561 от 03.06.2021 г

Соискатель Гиголаев Андрей Михайлович, 26 июня 1994 года рождения. В 2018 году соискатель окончил магистратуру Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» по специальности Биология, специализации Биоорганическая химия. С 2018 по 2022 гг. обучался в аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Диссертация выполнена в лаборатории молекулярных инструментов для нейробиологии ИБХ РАН. Научный руководитель – Василевский Александр Александрович, кандидат химических наук, руководитель лаборатории молекулярных инструментов для нейробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Шайтан Алексей Константинович - д.ф.-м.н., чл.-корр. РАН, доцент кафедры биоинженерии биологического факультета ФГБОУ ВО "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова", и Амахин Дмитрий Валерьевич - к.б.н., вед.н.с. лаборатории молекулярных механизмов нейронных взаимодействий ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук дали **положительные** отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, С.-Петербург, в своем **положительном**

отзыве, подписанном к.б.н., вед.н.с., зав. группой моделирования нейродегенеративных заболеваний в лаборатории Ионных каналов клеточных мембран Владимиром Александровичем Вигонтом и утвержденным директором Института цитологии, чл.-корр. РАН Томилиным Алексеем Николаевичем, указала, что диссертационная работа Гиголаева Андрея Михайловича «Молекулярные основы селективности пептидных поровых блокаторов калиевых каналов», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9. Биоорганическая химия, соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. № 1539; 26.09.2022 г. № 1690; 26.01.2023 г. № 101), а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9. — Биоорганическая химия.

Соискатель имеет 9 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 6 работ, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано 6 работ объемом 9 печ.л. из списка, рекомендованного Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций (входят в базы данных Web of Science и Scopus). В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы по теме, в которые А.М. Гиголаев внес основной либо существенный вклад, включают:

1. Kuzmenkov A.I., Nekrasova O.V., Peigneur S., Tabakmakher V.M., **Gigolaev A.M.**, Fradkov A.F., Kudryashova K.S., Chugunov A.O., Efremov R.G., Tytgat J., Feofanov A.V., Vassilevski A.A., 2018. Kv1.2 channel-specific blocker from *Mesobuthus eupeus* scorpion venom: Structural basis of selectivity // *Neuropharmacology*. V. 143. P. 228–238.
2. **Gigolaev A.M.**, Kuzmenkov A.I., Peigneur S., Tabakmakher V.M., Pinheiro-Junior E.L., Chugunov A.O., Efremov R.G., Tytgat J. and Vassilevski A.A., 2020. Tuning Scorpion Toxin Selectivity: Switching from Kv1.1 to Kv1.3 // *Front. Pharmacol.* V. 11:1010.
3. Tabakmakher V.M., **Gigolaev A.M.**, Peigneur S., Krylov N.A., Tytgat J., Chugunov A.O., Vassilevski A.A., Efremov R.G., 2021. Potassium channel blocker crafted by α -hairpinin scaffold engineering // *Biophys. J.* V. 120. P. 2471–2481.
4. Табакмахер В.М., Кузьменков А.И., **Гиголаев А.М.**, Пиньейро-Жуниор Э.Л., Пеньёр С., Ефремов Р.Г., Титгат Я., Василевский А.А., 2021. Искусственный пептидный лиганд калиевого канала Kv1.1 с высокой селективностью // *Российский физиологический журнал им. ИМ Сеченова*. V. 107. P. 584–604
5. **Gigolaev A.M.**, Lushpa V.A., Pinheiro-Junior E.L., Tabakmakher V.M., Peigneur S., Ignatova A.A., Feofanov A. V., Efremov R.G., Mineev K.S., Tytgat J., Vassilevski A.A., 2022. Artificial pore blocker acts specifically on voltage-gated potassium channel isoform Kv1.6 // *J. Biol. Chem.* V. 298.
6. **Гиголаев А.М.**, Пиньейро-Жуниор Э.Л., Пеньёр С., Титгат Я., Василевский А.А., 2022. Высокоаффинный Kv1.2-селективный пептид // *Российский физиологический журнал им. ИМ Сеченова*. V. 108. P. 1627–1638.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Отзыв официального оппонента д.ф.-м.н., чл.-корр. РАН Шайтана Алексея Константиновича. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1). На рисунке 1 приведено филогенетическое дерево, но не указаны параметры его построения, в частности модель замен, использованная для оценки филогенетического расстояния и алгоритм построения дерева (максимальное правдоподобие, максимальная парсимония и т.д.)

2). В оформлении автореферата и текста диссертации автору следовало бы более строго следовать рекомендациям советующего ГОСТ, в частности, в общей характеристике работы более подробно указать степень разработанности темы исследования, методологию исследования, степень достоверности результатов, в заключении указать рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы, в более общем виде сформулировать положения, выносимые на защиту.

3). Текст диссертации написан местами очень сухим языком и не всегда легок для понимания, часто используется пассивный залог, в результате не всегда понятно, на основе чего делаются те или иные утверждения. Пример со страницы 63 «В свою очередь, анализ данных по мутагенезу VmKTX позволил нам предложить новый вариант. Замена D33N в последовательности VmKTX приводит к увеличению активности по отношению к каналу KV1.3. Производное VmKTX, названное ADWX-1, содержит остатки R11 и H33 и блокирует KV в субнанолярных концентрациях.» В каждом предложении не хватает каких-то слов, например, объясняющих – вариант чего позволил предложить анализ?, к увеличению активности чего приводит замена? Производное -- это пептид?

4). В представленной работе автор выполнял лишь часть исследований. В частности, молекулярное моделирование проводилось коллегами автора. В то же время первая цель диссертации связана исключительно с моделированием. На мой взгляд цели лучше формулировать так, чтобы их достижение максимально зависело от работы самого автора диссертационного исследования.

2. Отзыв официального оппонента к.б.н. Амахина Дмитрия Валерьевича. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1). Введение к диссертации довольно сжатое, и в нем отсутствуют общепринятые разделы «Актуальность работы», «Теоретическое и практическое значение работы», «Положения, выносимые на защиту» и т.п., что можно отнести к формальным недостаткам работы.

2). Как уже упоминалось выше, актуальность и мотивация работы раскрыта достаточно слабо. В коротком введении приведен только один аргумент, иллюстрирующий актуальность работы, который упрощенно можно сформулировать так: KV1 каналы очень важны, поэтому их надо изучать. Хотелось бы, чтобы диссертант раскрыл эту мысль более подробно и привел реальные примеры того, зачем практикующим электрофизиологам могут понадобиться разработанные в ходе выполнения работы пептидные блокаторы. Есть ли у KV1-каналов какая-то особенная роль в генерации потенциалов действия нейронам, отличающая их от других потенциал-зависимых каналов? Приведите пример

того, как ионные каналы исследуемых типов влияют на особенности генерации потенциалов действия в нейронах.

3). На стр. 54 приводятся значения потенциалов реверсии для калиевых токов. Не ясно почему они имеют столь низкие значения (-5 - -7 мВ). Почему в экспрессирующей системе был такой слабый трансмембранный градиент ионов калия, ведь в большинстве клеток, экспрессирующих K_v , имеется сильный трансмембранный градиент концентрации этого иона? Зачем вообще анализировалось изменение потенциала реверсии под действием MeKTx11-1 (для других пептидов этого не делалось), Вы подозреваете возможность изменения ионной селективности канала под действием пептида? Будут ли полученные Вами выводы о характере взаимодействия пептида с каналом справедливы и в случае наличия сильного трансмембранного градиента концентрации ионов калия.

4). На стр. 60 утверждается, что охарактеризованные пептидные блокаторы могут быть применены для коррекции нарушений, «связанных с мутациями, которые приводят к увеличению проводимости каналов». Можете ли Вы привести пример подобных мутаций и связанных с ними патологий?

5). На рис. 24Б (стр. 76) кривые доза-эффект для K_v 1.2 и 1.3 явно имеют отличающийся наклон, что указывает об отличающемся коэффициенте Хилла. На рис. 32В (стр. 90) аналогичное изменение наклона. Не могли бы Вы прокомментировать этот результат?

6). Ни в одном описанном эксперименте Вы не тестировали разрабатываемые пептиды на представителях других подсемейств K_v . Не могло ли получиться, что внося модификации в структуру пептида Вы могли снизить их селективность относительно K_v1 , добавив способность блокировать потенциал-зависимые калиевые каналы других подсемейств?

3. Отзыв ведущей организации. Отзыв положительный, содержит следующие замечания и вопросы:

Допущенные опечатки носят несистематический характер и не снижают общее положительное впечатление от работы. К недостаткам оформления следует отнести слабое разделение между основным текстом и подписями к рисункам, что несколько затрудняет чтение диссертации.

Отзыв содержит следующие вопросы:

1). Есть ли предположения, как исследуемые селективные блокаторы будут воздействовать на природные гетеромерные каналы. 2). Могут ли предложенные подходы использоваться для дизайна высокоспецифичных блокаторов, различающих различный субъединичный состав гетеромерных каналов. 3). Предполагаются ли какие-либо ограничения на совместное использование селективных пептидных лигандов в составе «коктейля» ингибиторов при исследованиях электрофизиологических профилей различных клеток. 4). Планируется ли применение использованных в работе подходов для дизайна, например, тканеспецифичных блокаторов, эффективно модулирующих работу совокупности каналов, характерных для конкретного типа клеток/тканей, но, в то же время, слабо воздействующих на каналы в других типах клеток/тканей.

4. Отзыв на автореферат д.б.н., проф. Абрамочкина Дениса Валерьевича, вед.н.с. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Отзыв положительный, содержит один вопрос: Возможно ли появление сродства к потенциал-управляемым калиевым каналам других подсемейств при внесении специфических замен в исходные пептиды?

5. Отзыв на автореферат к.б.н. Узун Марии Михайловны, м.н.с. ФИЦ Биотехнологии РАН. Отзыв положительный, были заданы следующие вопросы: 1). Какие имеются посттрансляционные модификации у токсинов из яда скорпионов? 2). Насколько сильно такие модификации влияют на связываемость токсинов с каналами? 3). Проявляют ли активность на бактериальных каналах получаемые пептиды в составе гибридного белка?

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их большим опытом в компьютерном моделировании биомолекулярных систем и изучении электровозбудимости клеток и, в частности, ионных каналов, которые подтверждены множественными публикациями в высокорейтинговых журналах. Тематика работ официального оппонента Шайтана А.К. связана с компьютерным моделированием и изучением взаимодействия гистонов и ДНК. Официальный оппонент Амахин Д.В. является ведущим научным сотрудником лаборатории Молекулярных механизмов нейронных взаимодействий и занимается изучением функциональных изменений в моделях экспериментальной эпилепсии. Коллектив ведущей организации известен своими работами в области изучения молекулярных механизмов заболеваний нервной системы, в частности болезни Гентингтона. Высокая квалификация, большой опыт исследовательской работы оппонентов и представителей ведущей организации позволяет им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований разработан подход получения селективных пептидных лигандов потенциал-чувствительных калиевых каналов $K_v1.1-1.3$ и 1.6 при использовании методов молекулярного моделирования комплексов каналов с пептидными токсинами скорпионов и сайт-направленного мутагенеза генов пептидов.

Теоретическая значимость исследования заключается в том, что было показано, что применение методов компьютерного моделирования комплексов каналов с пептидными токсинами имеет высокую предсказательную силу для объяснения селективности пептидных токсинов. Также было показано, что аминокислотные замены могут приводить к изменению аффинности пептидных лигандов как напрямую, когда соответствующий остаток пептида взаимодействует с каналом, так и опосредованно — за счет влияния на соседние остатки пептида и образование ими контактов с мишенью. Также, вносимые аминокислотные замены могут вызывать изменение конформации молекулы, что приводит к перераспределению молекулярных контактов и изменению активности лиганда. Это позволяет расширить общие представления о том, как

происходит взаимодействие токсинов с различными изоформами потенциал-чувствительных калиевых каналов, в частности о механизмах селективности пептидных лигандов.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики состоит в том, что полученные в результате селективные и высокоаффинные пептидные лиганды каналов $K_v1.1-1.3$ и 1.6 могут быть использованы в изучении распределения данных изоформ в нервной и других тканях организма, гомо- или гетеромерные формы они образуют – в дальнейшем подобная информация о различиях в наборе каналов может быть применена для улучшения терапии различных заболеваний с целью снижения побочных эффектов от терапевтических средств. Также возможно использование полученных пептидов в изучении патологических состояний, связанных с нарушением работы этих каналов.

Достоверность результатов исследования сомнений не вызывает: исследования проводились с использованием современных научных методов, экспериментальные данные были получены с использованием сертифицированного оборудования, воспроизводимость результатов неоднократно продемонстрирована, при анализе данных были использованы современные методы сбора и обработки информации.

Личный вклад соискателя состоит в получении большинства рекомбинантных пептидов в бактериальной системе экспрессии, получении части результатов электрофизиологических экспериментов, активное участие в планировании экспериментов, активное обсуждение результатов компьютерного моделирования и электрофизиологических экспериментов, активное участие в написании статей. Создание моделей комплексов пептидов с каналами и эксперименты по молекулярной динамике производились членами лаборатории моделирования биомолекулярных систем и группы анализа структуры мембранных белков *in silico* ИБХ РАН Ефремовым Р.Г., Чугуновым А.О., Табакмахером В.М. и Крыловым Н.А. Эксперименты с использованием спектроскопии кругового дихроизма и изучение цитолитической активности Tk-hefu-11 было выполнено членами лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН Феофановым А.В. и Игнатовой А.А. Исследование Tk-hefu-11 методами ЯМР-спектроскопии было выполнено в лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии Лушпой В.А. и Минеевым К.С. Некрасовой О.В. были получены рекомбинантные токсины MeKTx11-1, 3 и их мутанты. Масс-спектры изучаемых пептидов были получены Торопыгиным И.Ю. из группы масс-спектрометрии ЦКП «Протеом человека». Фрадковым А.Ф. (Евроген) было произведено внесение точечных замен в ген канала $K_v1.3$. Электрофизиологические эксперименты были проведены совместно с лабораторией токсикологии и фармакологии университета г. Лёвен, Бельгия.

Диссертационный совет 24.1.037.01 заключил, что диссертационная работа Гиголаева Андрея Михайловича является законченной научно-квалификационной работой, в которой было существенно расширено представление о взаимодействии

токсина из яда скорпионов и потенциал-чувствительных калиевых каналах и вносит заметный вклад в развитие биоорганической химии и нейробиологии.

Работа написана автором самостоятельно, содержит новые и актуальные научные результаты и по своему содержанию соответствует специальности 1.4.9. – Биоорганическая химия. Таким образом диссертационная работа Гиголаева Андрея Михайловича «Молекулярные основы селективности пептидных поровых блокаторов калиевых каналов» представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9. – Биоорганическая химия, соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденном Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; № 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. № 1539; 26.09.2022 г. №1690; 26.01.2023 г. №101).

В ходе защиты диссертации были высказаны следующие вопросы:

1. Отслеживается ли путь от вносимых модификаций до потенциального лекарства, действующего на калиевые каналы? Какой канал наиболее интересует исследователей?
2. На что исследователям необходимо обращать внимание при задаче получения селективных лигандов на другие каналы?
3. Сколько моделей токсин-канал было использовано в дополнение к упомянутой в докладе?
4. Могут ли привести внесенные замены в структуру антимикробного пептида Тк-АМР-Х2 к появлению цитотоксической активности?

Соискатель Гиголаев Андрей Михайлович ответил на задаваемые ему в ходе заседания вопросы и привел собственную аргументацию.

1. Действительно, мы видим применение полученных пептидов в качестве лекарственных средств для болезней, вызванных мутациями с приобретением функции в генах калиевых каналов.
2. Необходимо для каждого индивидуального соединения проводить молекулярную динамику, поскольку мы не всегда самостоятельно можем предсказать, какие изменения в структуре вызовут внесенные замены.
3. К началу экспериментов была известна всего одна структура комплекса токсин-канал, она и была использована для построения других моделей. Уже позже появились другие структуры, и мы их сравнивали, значимых отличий от моделей мы не обнаружили.
4. Действительно, пептид Тк-hefu-11 в концентрации больше двух микромолей на литр стал проявлять цитолитическую активность на ооцитах лягушки *Xenopus laevis*. Однако дополнительные эксперименты по выявлению антимикробной и цитотоксической активностей показали отрицательные результаты.

На заседании 6 декабря 2023 г. диссертационный совет постановил за решение задачи по созданию селективных лигандов потенциал-чувствительных калиевых каналов присудить Гиголаеву Андрею Михайловичу ученую степень кандидата химических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человека, из них 7 докторов наук (по научной специальности рассматриваемой диссертации 1.4.9. - биоорганическая химия), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 21, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель
диссертационного совета

академик РАН Мирошников А.И.

Ученый секретарь
Диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.



7 декабря 2023 г.